

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-088383

(43)Date of publication of application : 25.03.2003

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

C12Q 1/02

C12Q 1/68

(21)Application number : 2001-284298

(71)Applicant : TOKYO INST OF TECHNOL

(22)Date of filing : 19.09.2001

(72)Inventor : IGAI ATSUSHI
OSADA TOSHIYA
KIN KENTETSU

(54) METHOD FOR COLLECTING BIOMOLECULE FROM LIVE CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a means for collecting a biomolecule such as an RNA from a live cell.

SOLUTION: This method for collecting the biomolecule is characterized as comprising at least the following steps (1) and (2). (1) a step of inserting a needle capable of binding to the biomolecule to be collected into the live cell using an apparatus capable of performing fine positional control and (2) a step of pulling out the needle from the live cell using the apparatus.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 19.09.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-88383

(P2003-88383A)

(43)公開日 平成15年3月25日(2003.3.25)

(51)IntCl'	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02		1/68	A 4 B 0 6 3
1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 有 請求項の数7 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願2001-284298(P2001-284298)

(22)出願日 平成13年9月19日(2001.9.19)

(71)出願人 391012316

東京工業大学長

東京都目黒区大岡山2丁目12番1号

(72)発明者 猪飼 篤

東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 東京
工業大学内

(72)発明者 長田 俊哉

東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 東京
工業大学内

(74)代理人 100107870

弁理士 野村 健一 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生細胞からの生体分子の採取方法

(57)【要約】

【課題】 生きた細胞からRNAなどの生体分子を採取する手段を提供する。

【解決手段】 少なくとも以下の(1)及び(2)の工程を含むことを特徴とする生体分子の採取方法。

(1)採取しようとする生体分子と結合し得る針を、微細な位置制御が可能な装置を用いて、生細胞に刺し込む工程

(2)前記針を、前記装置を用いて、生細胞から引き抜く工程

【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも以下の(1)及び(2)の工程を含むことを特徴とする生体分子の採取方法。

(1) 採取しようとする生体分子と結合し得る針を、微細な位置制御が可能な装置を用いて、生細胞に刺し込む工程

(2) 前記針を、前記装置を用いて、生細胞から引き抜く工程

【請求項2】 微細な位置制御が可能な装置が、原子間力顕微鏡であることを特徴とする請求項1記載の生体分子の採取方法。

【請求項3】 針が、生体分子と特異的に結合し得る物質で修飾されたウィスカーであることを特徴とする請求項1又は2記載の生体分子の採取方法。

【請求項4】 ウィスカーが、ZnOウィスカーであることを特徴とする請求項3記載の生体分子の採取方法。

【請求項5】 生体分子が、mRNAである請求項1乃至4のいずれか一項に記載の生体分子の採取方法。

【請求項6】 少なくとも以下の(1)及び(2)の工程を含むことを特徴とする生細胞内で発現している遺伝子の同定方法。

(1) 請求項5記載の方法によって生細胞からmRNAを採取する工程

(2) 前記mRNAと、発現が予想される遺伝子に特異的な配列を含むオリゴヌクレオチドとを共存させ、前者を鋳型とし、後者をプライマーとするポリメラーゼ連鎖反応が起きるかどうかを調べる工程

【請求項7】 少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とする生細胞内で発現している遺伝子の同定方法。

(1) 請求項5記載の方法によって生細胞からmRNAを採取する工程

(2) 前記mRNAからcDNAを合成する工程

(3) 前記cDNAを、発現が予想される複数の遺伝子断片が固定されているDNAチップに近づけ、前記cDNAと固定されている遺伝子断片間に生じる力を測定する工程

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生きている状態の細胞から種々の生体分子を採取する方法、及びその方法を利用した生細胞内で発現している遺伝子の同定方法に関する。本発明の方法により、一つの細胞における遺伝子発現等の変化を経時的に調べることが可能になる。

【0002】

【従来の技術】最近の生物学研究の大きな流れの一つは、個々の生物試料の個性を調べようというものである。タンパク質などの生体高分子にしても、たくさんの分子からなる溶液中の酵素活性などといった全体の性質を調べるだけでなく、一分子の活性を調べるというもので、これらの学問は一分子生化学と呼ばれている。

【0003】細胞生物学の分野においても一つ一つの細胞の個性を調べる研究が行われるようになってきた。例えば、脳のある領域の神経細胞では、従来は同じ種類の細胞の集まりとして扱われてきた。これら同じ種類の細胞集団の中の個々細胞のレセプターなどの微妙な発現の違いを調べることにより、より複雑な機能解析を行うことができるのではないかと考えられるようになってきた。一分子生化学に対して一細胞生物学と呼ぶことができよう。

【0004】一つの細胞での遺伝子発現変化などを観察するためには細胞を生きたまま、そこからわずかな量の生体分子を取り出し解析する技術が不可欠である。今までは同じ状態にあると思われる複数の細胞間での比較を行ってきたが、今後微妙な細胞間の変化などを調べる一細胞生物学を行うには十分な方法とはいえない。

【0005】最近、複数の鋤鼻神経細胞の一つ一つからcDNAライブラリーを作り、それらを比較することにより、微妙な遺伝子の発現を調べて、フェロモンレセプターのクローニングなどが行われた。この方法は大変画期的であるが、今までの方法と同じように細胞を殺してしまうため、経時的な変化を一つの細胞で調べることができない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】以上述べたように、従来の生体分子の採取方法は、採取源とする細胞を殺すことを前提としており、細胞を生かした状態で生体分子を採取しようとする方法は知られていなかった。

【0007】本発明は、このような技術的背景の下になされたものであり、その目的は、生きた細胞からRNAなどの生体分子を採取する手段を提供し、個々の細胞について経時的な変化を連続的に記録することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は、一つの細胞での遺伝子発現変化などを観察するためには、生きた状態の細胞から生体分子を取り出すことが必要であるという着想を得、この着想を基に本発明を完成した。

【0009】即ち、本発明は、少なくとも以下の(1)及び(2)の工程を含むことを特徴とする生体分子の採取方法である。

(1) 採取しようとする生体分子と結合し得る針を、微細な位置制御が可能な装置を用いて、生細胞に刺し込む工程

(2) 前記針を、前記装置を用いて、生細胞から引き抜く工程

また、本発明は、少なくとも以下の(1)及び(2)の工程を含むことを特徴とする生細胞内で発現している遺伝子の同定方法である。

(1) 上記方法によって生細胞からmRNAを採取する工程

(2) 前記mRNAと、発現が予想される遺伝子に特異的な配列を含むオリゴヌクレオチドとを共存させ、前者を鋳

型とし、後者をプライマーとするポリメラーゼ連鎖反応が起きるかどうかを調べる工程

更に、本発明は、少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とする生細胞内で発現している遺伝子の同定方法である。

(1) 上記方法によって生細胞からmRNAを採取する工程

(2) 前記mRNAからcDNAを合成する工程

(3) 前記cDNAを、発現が予想される複数の遺伝子断片が固定されているDNAチップに近づけ、前記cDNAと固定されている遺伝子断片間に生じる力を測定する工程

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0010】本発明の生体分子の採取方法は、少なくとも以下の(1)及び(2)の工程を含むことを特徴とするものである。

【0011】工程(1)では、採取しようとする生体分子と結合し得る針を、微細な位置制御が可能な装置を用いて、生細胞に刺し込む。

【0012】生体分子としては、mRNA、tRNA、rRNA、DNA、タンパク質、脂質、糖などを挙げることができる。

【0013】使用する針は、生体分子と結合し得るものであればどのようなものでもよく、例えば、金属酸化物のウィスカー(例えば、ZnOウィスカーなど)、カーボンナノチューブなどを使用することができる。ウィスカー等は、そのままの状態でも物理的吸着力によって生体分子と結合できるが、結合性を向上させるため、生体分子と特異的に結合し得る物質で修飾することが好ましい。生体分子と特異的に結合し得る物質としては、例えば、mRNAを採取する場合であればオリゴdTを例示することができ、タンパク質、脂質、糖を採取する場合であれば抗体を例示することができる。また、特定の配列を持つ核酸を採取しようとする場合には、その核酸と相補的な配列を持つ核酸で針を修飾してもよい。

【0014】針の修飾方法は、修飾する物質及び針の種類に応じて適宜決めることができる。例えば、オリゴdTでZnOウィスカーを修飾する場合は、表面にアミノ基を導入したウィスカーとオリゴdTを含み5'チオール化したオリゴDNAとを、適当な架橋剤と反応させることにより行うことができる。

【0015】微細な位置制御が可能な装置は、生細胞を殺すことなく、針の刺し込み操作及び後述する引き抜き操作が可能なものであればどのようなものでもよく、市販のマイクロマニピュレーターや原子間力顕微鏡を使用することができる。

【0016】針の生細胞への刺し込みは、例えば、原子間力顕微鏡のカンチレバーに針を固定し、カンチレバーを採取しようとする生細胞の上方に移動させた後、下方に移動させることにより行うことができる。針のカンチレバーへの固定は一般的な方法、例えば、エポキシなどを用いて行うことができる。このような針の刺し込み等の操作は顕微鏡観察下で行うのが好ましい。

【0017】採取源とする生細胞はどのようなものでもよく、例えば、線維芽細胞、神経細胞、グリア細胞などを例示できるが、これらに限定されるわけではない。

【0018】工程(2)では、前記針を、前記装置を用いて、生細胞から引き抜く。

【0019】針の刺し込みから引き抜きまでの時間は特に限定されないが、細胞へのダメージを考えれば短い方がよく、より多くの生体分子を取り出すには長い方がよい。刺し込みから引き抜きまでは、通常5～10秒程度である。

【0020】以上の生体分子の採取方法を利用して、生細胞内で発現している遺伝子の同定を行うことができる。即ち、生細胞内からmRNAを採取し、そのmRNAがどの遺伝子に由来するかを調べることにより、生細胞内でどのような遺伝子が発現していたかがわかる。具体的な方法としては、以下の第一の方法、及び第二の方法を例示できる。

【0021】第一の方法は、少なくとも以下の(1)及び(2)の工程を含むことを特徴とするものである。

(1) 上記方法によって生細胞からmRNAを採取する工程
(2) 前記mRNAと、発現が予想される遺伝子に特異的な配列を含むオリゴヌクレオチドとを共存させ、前者を鋳型とし、後者をプライマーとするポリメラーゼ連鎖反応が起きるかどうかを調べる工程

mRNAが、予想した遺伝子由来のものであればポリメラーゼ連鎖反応による増幅断片が生じるが、予想した遺伝子由来のものでなければ増幅断片は生じない。従って、増幅断片の有無を電気泳動等により調べることにより、生細胞内で発現していた遺伝子がどのようなものであったかがわかる。

【0022】第二の方法は、少なくとも以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とするものである。

(1) 上記方法によって生細胞からmRNAを採取する工程
(2) 前記mRNAからcDNAを合成する工程

(3) 前記cDNAを、発現が予想される複数の遺伝子断片が固定されているDNAチップに近づけ、前記cDNAと固定されている遺伝子断片間に生じる力を測定する工程
cDNAが予想した遺伝子断片に由来するものであれば、cDNAを遺伝子断片に近づけると、両者間の引力、斥力に変化が生じる。従って、この変化を調べることにより、生細胞内で発現していた遺伝子がどのようなものであったかがわかる。引力等の変化は、原子間力顕微鏡などにより測定することができる。

【0023】

【実施例】1. ZnOウィスカーの修飾

ZnOウィスカーを無水トルエンで洗浄後、50%アミノプロピルシランの入ったトルエン溶液中で一晩ローテーターで攪拌し、ZnOウィスカー表面にアミノ基を導入した。反応終了後、ZnOをメタノールで3回洗浄し、その後、メタノール中に保存した。次に、架橋剤(Sulfo-LC

-SPDP) を使って5'チオール化したオリゴDNA (AAACGACG GCCAGTGAATTGTATACGACTCACTATAGGCGC(T)₂₄) をZnOウィスカー表面に化学的に結合させた。

【0024】修飾が上手くいったかどうかは、赤い蛍光を発する色素を結合したポリAとの反応により調べた。

図1BにポリAとの反応により赤く染まったZnOウィスカーを示す。

2. ZnOウィスカーのAFMカンチレバーへの固定

実体顕微鏡 (SZX12、オリンパス) にヒーター (MP200DM SH、Kitazato) 及びマイクロマニピュレータ (成茂科学) をセットした。ヒーターの温度は70℃に設定した。小さく切ったスライドガラス (約1.5cm角程度) を3個用意し、それぞれにエポキシ (グレード1001、油化シェル。融点64℃)、ZnOウィスカー、AFMチップを載せた。

【0025】エポキシが溶け、ZnOウィスカーが乾燥した時点で、以下の作業を開始した。実体顕微鏡で観察しつつ、マニピュレータのマイクロピペットをエポキシに少しだけ浸けた。これにより、ピペット先端にごく少量のエポキシが、球状になって付着した。そのピペット先端を、今度はAFMカンチレバー先端に軽く触れさせた。これにより、カンチレバー先端にもごく少量のエポキシが付いた。次に、もうひとつのマニピュレータピペットを使い、ZnOウィスカーをひとつだけ拾い上げた。ZnOウィスカーに針先を触れさせると、静電気力によってZnOウィスカーがピペット先端に付着した。そして拾い上げたZnOウィスカーを、先ほどエポキシを付けた場所の上に置き、室温に戻すと樹脂が固まって、ZnOウィスカーがAFMカンチレバー先端に固定された。

3. 試料とする生細胞の調製

本実施例では、RNAの採取源として、BALB/cマウス由来の繊維芽細胞であるBALB 3T3細胞を用いた。培養環境は、5% CO₂存在下で、37℃に温度を保つようにした。培地は、D-MEM/F-12培地 (Gibco BRL) に100 U/mLペニシリン - 100 mg/mLストレプトマイシン (Gibco BRL) を加えたものを作り、それと非働化处理したFBS (fetal bovine serum、JRH Biosciences) 血清の比率が9:1になるよう混合した培地を用いた。継代後、約3日後に培地を交換した。継代は、約1週間毎に行った。継代方法であるが、コンフルエントになった細胞を0.25%トリプシン - 1mM EDTA (Gibco BRL) で処理し、遠心沈殿 (700 rpm、10分) させた後、全体の1/10を継代した。通常は角ディッシュ (T-25) を用いて培養するが、本実施例では35mmベトリディッシュを用いた。

4. 生細胞からのmRNAの採取

原子間力顕微鏡の試料台に、上述のBALB 3T3細胞を置き、カンチレバーに固定されたZnOウィスカーを細胞の刺したい部位に移動させた。この作業は、原子間力顕微鏡に付随する光学顕微鏡で観察しながら行った。ZnOウィスカーの位置調整が完了した後、ピエゾを動かして、ZnOウィスカーを細胞に刺した。ZnOウィスカーを細胞に

刺した直後の写真を図2に示す。図中の丸印で示された細胞にZnOウィスカーを刺した。ZnOウィスカーは、この図ではみえないが、カンチレバー (三角の部分) の先端に付いている。

【0026】ZnOウィスカーを細胞に刺した後、すばやくカンチレバーを原子間力顕微鏡から取り外した。

5. mRNAの解析

ZnOウィスカーに付着したmRNAを鋳型とし、QIAGENのPCR用キットを用いて、RT-PCRとnested PCRを行った。プライマーは、β-アクチン遺伝子に特異的な二組のプライマーを用いた。これらのプライマーを用いた場合、ZnOウィスカーにβ-アクチン遺伝子由来のmRNAが付着していれば、約400bpの断片が増幅される (図3)。

【0027】PCRの条件及びプライマーの配列は下記の通りである。

<1st RT-PCRのサイクル>

逆転写	50℃	30分
酵素の活性化	95℃	15分
増幅 変性	94℃	45秒
アニーリング	51℃	45秒 ×35
伸長	72℃	1分
最終伸長	72℃	10分

<2nd nested PCRのサイクル>

酵素の活性化	95℃	15分
増幅 変性	94℃	45秒
アニーリング	55℃	45秒 ×20
伸長	72℃	1分
最終伸長	72℃	10分

<1st RT-PCRのプライマー>

Forward Primer :5'-GTG GGC CGC TCT AGG CAC CAA-3'
(配列番号1)

Reverse Primer:5'-CTC TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC-3'
(配列番号2)

<2nd nested PCRのプライマー>

Forward Primer :5'-GAC TCC TAT GTG GGT GAC GAG G-3'
(配列番号3)

Reverse Primer:5'-GGA TCT TCA TGA GGT AGT CCG TCA-3'
(配列番号4)

上記二段階のPCRを行った後、その増幅産物を電気泳動した。ゲルの写真を図4に示す。この図に示すように、中央のレーンには約400bpのバンドが検出された。このバンドは、β-アクチンmRNA由来のものであると考えられる。なお、図中の左端のレーンはマーカー、右端のレーンはコントロールのレーンである。

【0028】

【発明の効果】本発明は、生きている状態の細胞から生体分子を採取する方法を提供する。ある細胞における遺伝子発現の経時的変化を調べる場合、従来はクローン化された複数の細胞を用いていたが、本発明の方法によ

り、一個の細胞についての経時的変化を調べることが可能になる。これにより、クローン細胞を用いる場合よりも、より正確な発現情報を得ることができるようになる。また、クローン化できない細胞についても、発現する遺伝子の経時的変化を調べることが可能になる。

【0029】更に、本発明の方法では、ウィスカーの刺す場所を変えることにより、細胞の場所による発現の違いも調べることができる。

【0030】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```

<;110>; President of Tokyo Institute of Technology
<;120>; METHOD FOR PICKING BIOMOLECULES FROM A VIABLE CELL
<;130>; P01-054
<;160>; 4
<;170>; PatentIn Ver. 2.1
<;210>; 1
<;211>; 21
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence

<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA
<;400>; 1
gtgggccgct ctaggcacca a                                21
<;210>; 2
<;211>; 24
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA
<;400>; 2
ctctttgatg tcacgcacga tttc                                24
<;210>; 3
<;211>; 22
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA
<;400>; 3
gactcctatg tgggtgacga gg                                22
<;210>; 4
<;211>; 24
<;212>; DNA
<;213>; Artificial Sequence
<;220>;
<;223>; Description of Artificial Sequence: SYNTHETIC DNA
<;400>; 4
ggatcttcat gaggtagtcc gtca                                24

```

【配列表フリーテキスト】

【配列番号1】配列番号1は、実施例で行ったRT-PCRのForward Primerの塩基配列を示す。

【0031】

【配列番号2】配列番号2は、実施例で行ったRT-PCRの

Reverse Primerの塩基配列を示す。

【0032】

【配列番号3】配列番号3は、実施例で行ったnested PCRのForward Primerの塩基配列を示す。

【0033】

【配列番号4】配列番号4は、実施例で行ったnested PCRのReverse Primerの塩基配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【図1】ZnOウィスカーの形状を示す顕微鏡写真(図1 A)、オリゴdTで修飾したZnOウィスカーと蛍光性ポリAのアニーリングの様子を示す蛍光顕微鏡写真(図1 B)

【図2】ZnOウィスカーを細胞に刺した直後の写真

【図3】実施例で使用したPCRプライマーと鋳型となるmRNAの位置を示す図

【図4】細胞から回収したmRNAを鋳型としたPCRによる増幅断片を示す写真

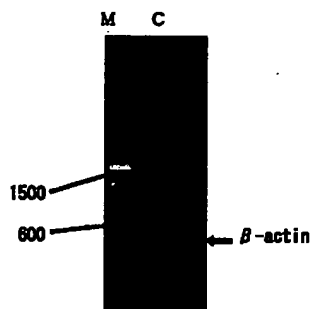
【図1】



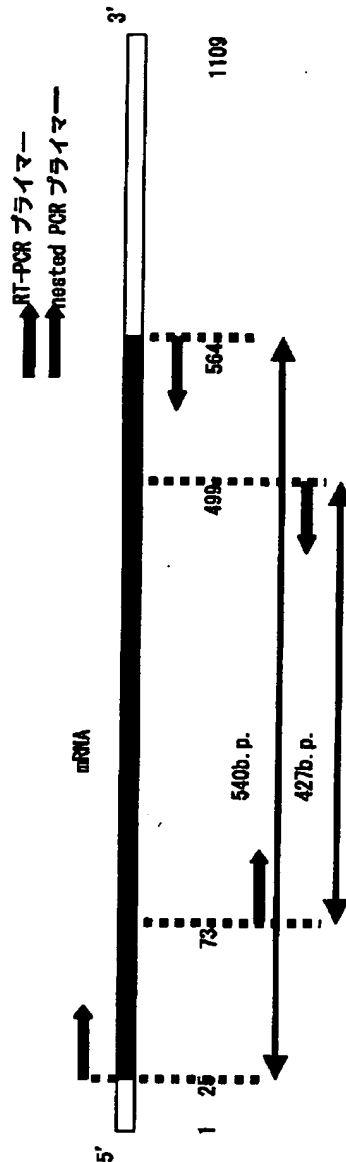
【図2】



【図4】



【図3】



BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(72)発明者 金 賢徹
東京都目黒区大岡山2丁目12番1号 東京
工業大学内

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA04 CA09 CA12 DA02
GA11 HA14
4B063 QA01 QA13 QQ53 QR32 QR55
QR62 QS12 QS25 QS34